

## Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera* L.

Naivy Pérez-Alonso\*, Alina Capote, Anabel Pérez, Leticia Gómez<sup>1</sup>, Elio Jiménez\*\*. \*Autora para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e-mail: [naivy@ibp.co.cu](mailto:naivy@ibp.co.cu)

\*\*Dirección actual: Tropical Research and Education Center. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. 18905 SW 280<sup>th</sup> Street. Homestead. USA. FL 33031

### RESUMEN

La alta demanda en las industrias de cosméticos y medicinal de *Aloe vera* L. ha provocado que el cultivo tradicional sea insuficiente para satisfacer el mercado actual. En Cuba, es utilizada como constituyente de numerosos productos farmacéuticos y cosméticos. Actualmente, una gran parte de la materia prima de *Aloe* es importada debido a la inexistencia de poblaciones suficientemente grandes para suplir la demanda. La propagación *in vitro* es una de las alternativas para incrementar la disponibilidad de biomasa de esta especie. Es por esto, que se estudió el efecto de la época del año en que fue tomado el material inicial para su introducción y el proceso de desinfección en el establecimiento de brotes *in vitro*. Además, se estudió el empleo de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación. Los resultados mostraron que se logró el establecimiento *in vitro* de ápices con un 93% de explantes libres de contaminantes microbianos tomando el material vegetal en la época de seca y desinfectándolo con NaClO al 2.0% durante 15 min. En la fase de multiplicación se obtuvieron los mejores resultados en los medios de cultivo que contenían la combinación de 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB, con un corte transversal a los brotes. En estas condiciones, se obtuvo un coeficiente de multiplicación estable durante nueve subcultivos con un valor máximo de 5.1.

Palabras clave: citoquininas, desinfección, época del año, manejo de explantes

## *In vitro* establishment and multiplication of *Aloe vera* L. shoots

### ABSTRACT

The high demand of *Aloe vera* L. in the pharmaceutical and cosmetic industries has caused that the traditional crop is insufficient to satisfy the current market. In Cuba, this plant is used as a constituent of many pharmaceutical and cosmetic products. At present, a large part of *Aloe* raw material is imported due to the lack of sufficiently large populations to meet all the demand. *In vitro* propagation is one of the alternatives to increase the availability of biomass of this specie. For this reason, this research was carried out in order to study the effect of the time of collecting plant material and conditions disinfection to establishment *in vitro* shoots. Besides, the use of growth regulators in multiplication phase was studied. The results showed that *in vitro* establishment of apices with 93% microbial contamination-free explants was achieved taking plant material in the dry season and disinfecting with 2.0% sodium hypochlorite for 15 min. In the multiplication phase were obtained best results in culture medium containing the combination of 2.0 mg l<sup>-1</sup> of 6-BAP and 0.5 mg l<sup>-1</sup> of AIB, making a transversal cut to shoot. In these conditions, the multiplication coefficients obtained was stable during nine subcultures with maximum valour of 5.1.

Key words: cytokinins, disinfection, season, management explants

### INTRODUCCION

Las plantas son fuentes de productos metabólicos de importancia comercial, empleados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (Lubbe y Verpoorte, 2011). Zárate *et al.* (2013) informaron que se estima que más de 200 000 productos naturales han sido

elucidados y que son caracterizados cada año aproximadamente 4 000 - 5 000 compuestos nuevos.

*Aloe vera* L. (sábila) pertenece a la familia *Xanthorrhoeaceae*, originaria del norte de África e introducida en las Antillas y América tropical donde crece en forma natural y se cultiva comercialmente (Grace, 2011). Los compuestos extraídos de las hojas de *A. vera*

poseen propiedades excepcionales que los hacen indispensables en la elaboración de múltiples productos terapéuticos nutricionales y de belleza. Tiene enorme demanda en las industrias farmacéuticas y cosméticas (Das *et al.*, 2010). Es por esto que el mercado de sus productos ha mostrado un marcado y sostenido ascenso (Amoo *et al.*, 2012). Al respecto, Lubbe y Verpoorte (2011) la mencionan como un ejemplo de planta con ingredientes comúnmente utilizados en la industria de cosméticos.

Es comprensible entonces el interés de grandes industrias en la producción de compuestos naturales de importancia comercial, cuya calidad y costos no se afecten por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción. Es en este contexto, donde los avances de la biotecnología vegetal, especialmente el cultivo de células y tejidos, constituyen una alternativa para la producción de cultivos de gran interés (Yesil-Celiktas y Vardar-Sukan, 2013).

La liberación temprana de polen con respecto a la receptividad del estigma (protandria) en combinación con la autoincompatibilidad reduce las oportunidades para la autopolinización en las flores hermafroditas (Imery-Buiza y Cequea-Ruiz, 2008). Este aspecto dificulta la propagación sexual de esta especie, por lo cual se realiza de forma vegetativa a través de hijuelos. Sin embargo, la tasa de propagación convencional por esta vía es demasiado lenta y baja. Esto conlleva a una insatisfacción en la demanda necesaria para la producción comercial (Arvind *et al.*, 2010), además de los riesgos que puede

conllevar este tipo de propagación en la diseminación de enfermedades fúngicas y bacterianas. Por todo lo expuesto se acentúa el déficit de estas plantas en el mercado nacional e internacional y el cultivo de tejidos, por las ventajas que ofrece, se ha convertido en una de las alternativas tecnológicas necesarias.

Varias especies de *Aloe* han sido micropropagadas (Aggarwal y Barna, 2004; Albany *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2010; Jayakrishna *et al.*, 2011). Sin embargo, en ninguno de los protocolos descritos refieren el estudio de la época de selección del material como un factor que podría incrementar la eficiencia en el establecimiento. Otros aspectos como el manejo de los explantes han sido poco estudiados y con mayor frecuencia se mencionan en la literatura científica cambios en la composición del medio de cultivo, especialmente los reguladores del crecimiento. Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo se propuso como objetivo establecer y multiplicar *in vitro* plantas de *A. vera* a partir de plantas cultivadas en campo.

## MATERIALES Y METODOS

### *Material vegetal*

Como material vegetal inicial se emplearon hijuelos sanos de plantas adultas de *A. vera* (Figura 1) con una altura entre 20 y 30 cm, medidos desde la base del tallo hasta el extremo distal de la hoja más larga. El material vegetal fue colectado directamente del cultivo en condiciones de campo en la Granja Suburbana Finca Sandino del municipio de Remedios, Villa Clara, Cuba.



Figura 1. Material vegetal de *Aloe vera* L. para el establecimiento *in vitro*. a: Aspecto de las plantas en condiciones de campo b: Hijuelo tomado de una planta adulta. c: Aspecto del explante previo al lavado y corte final (corte de la parte fibrosa del tallo, las raíces y las hojas externas). d: Explante listo para la desinfección.

### Procedimientos generales

Todos los experimentos se realizaron en condiciones asépticas. Las operaciones de transferencia y manipulación del material vegetal fueron realizadas en una cabina de flujo laminar horizontal. Los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave vertical a 120°C y 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión.

En todos los experimentos se utilizó medio de cultivo semisólido y se emplearon frascos de cultivo de vidrio con capacidad de 250 ml con 30 ml de medio de cultivo o tubos de ensayo (100x125 mm) que contenían 15 ml de medio de cultivo.

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS). Como agente gelificante se utilizó agar BioCen a razón de 7.0 g l<sup>-1</sup>. El pH de los medios de cultivo ajustado a 5.7 previo a la esterilización por autoclave con KOH 0.5N y HCl 0.5N.

### Establecimiento *in vitro*

Con el objetivo de definir la época del año propicia para la selección del explante inicial de *A. vera* para su establecimiento *in vitro* y el efecto del hipoclorito de sodio (NaClO) en la desinfección del material vegetal se realizaron los experimentos que se describen seguidamente. Se tomaron los hijuelos provenientes del cultivo en condiciones de campo en la época de seca (diciembre-abril) y en la época de lluvia (mayo-noviembre). Se utilizaron 60 explantes por cada época del año.

La época de seca (diciembre-abril) se caracterizó por una temperatura entre 27°C y 16.50°C, humedad relativa al 76.2%, mientras que las precipitaciones alcanzaron un valor de 21.38 mm según los valores promedios brindados por la Estación Provincial de Meteorología de Villa Clara. En la época de lluvia (mayo-noviembre) los valores de temperatura oscilaron entre 30°C y 22.9°C; la humedad relativa se comportó al 80.71 % para y las precipitaciones fueron de 199.87 mm.

Los hijuelos fueron separados individualmente y se les eliminaron los restos de suelo. En el laboratorio, se lavaron con abundante agua corriente y jabón líquido comercial hasta quedar

limpios. Luego se eliminó la parte fibrosa de la base del tallo, las raíces y las hojas externas de cada brote con ayuda de un bisturí. Se realizó un corte transversal del follaje, para reducir la altura del explante a 3.0 cm aproximadamente.

Los explantes obtenidos se emplearon para evaluar el efecto de tres concentraciones de NaClO (1.0; 2.0 y 3.0%; i.a) en la desinfección. Se colocaron en frascos de cultivo de 250 ml de capacidad que contenían la solución desinfectante y permanecieron durante 15 min en agitación en agitador orbital (Retomed) a 100 rpm (Figura 2a). Posteriormente se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua desionizada estéril en cabina de flujo laminar. Luego se procedió a eliminar la superficie necrosada del explante debido a la desinfección (Figura 2b). Con auxilio de pinza y bisturí se redujo el explante a 1.0 cm de altura y 0.5 cm de diámetro (Figura 2c) y se colocaron en tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo compuesto por sales MS, 20 mg l<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 2.5 g l<sup>-1</sup> de carbón activado, 7.0 g l<sup>-1</sup> de agar y 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa (Das *et al.*, 2010). El experimento fue repetido tres veces.

Los tubos de ensayo con los explantes fueron colocados en cámara de crecimiento a 27±2 °C con un fotoperíodo de 16 h con lámparas fluorescentes de luz blanca, con una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de 30-40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

A las cuatro semanas de cultivo se cuantificó el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles (hongos, levaduras y bacterias) y el número de explantes necrosados.

### Multiplicación *in vitro*

#### Manejo del explante

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto del seccionado del explante (corte transversal y transversal-longitudinal parcial), sobre el coeficiente de multiplicación. El corte transversal se realizó a una altura promedio de 1.0 cm desde la base del brote (Figura 3a) y el corte longitudinal-parcial se realizó desde la zona apical hasta la zona basal abarcando las tres cuartas partes de la altura del explante (Figura 3b).



Figura 2. Procedimiento de desinfección realizado a los explantes de *Aloe vera* L. a: Desinfección con NaClO en agitador orbital. b: Explante después de la desinfección y lavado con agua desionizada (3.0 cm de altura). c: Explante con 1.0 cm de altura y 0.5 cm de diámetro.



Figura 3. Seccionado del explante de *Aloe vera* L. a: corte transversal de la planta. b: corte transversal longitudinal-parcial.

Se colocaron cuatro explantes por frasco de cultivo de 250 ml de capacidad y se utilizaron 10 réplicas por tratamiento. Se utilizó el medio de cultivo empleado en el establecimiento *in vitro*. Los explantes fueron colocados en cámara de crecimiento de luz solar a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  y un fotoperíodo de 13/11h de luz/oscuridad con un rango de intensidad luminosa aproximada entre  $23.2$  y  $44.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  medido con un luxómetro EXTECH Light meter 401 025.

A los 45 días de cultivo se midió la altura de los brotes (cm) desde la base hasta la zona distal de la hoja más larga, se cuantificó el número de brotes totales por explante y se calculó el coeficiente de multiplicación por la fórmula:  $\text{CM} = \text{No. brotes totales} / \text{No. brotes iniciales}$ .

#### *Efecto de la combinación de auxina-citoquinina en la multiplicación in vitro*

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la combinación de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indol butírico (AIB) sobre la multiplicación *in vitro* de brotes de *A. vera*. Basado en el análisis de la literatura científica se incluyeron dos concentraciones de 6-BAP ( $2.0$  y  $8.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) combinadas con  $0.5$  de  $\text{mg l}^{-1}$  de AIB. Se utilizó un tratamiento control sin regulador del crecimiento para un total de seis tratamientos. Se emplearon 40 explantes por tratamiento.

Las condiciones de crecimiento de los explantes fueron las descritas en el acápite anterior. A los

45 días de cultivo se midió la altura de los brotes (cm) desde la base del explante hasta la zona distal de la hoja más larga, el número de brotes para calcular el coeficiente de multiplicación como se describió más arriba y se cuantificó el número de raíces formadas por explante.

Cuando se seleccionó el medio de cultivo de multiplicación donde se alcanzaron los mejores resultados para las variables descritas anteriormente, se realizaron nueve subcultivos del material vegetal, cada 45 días y se calculó el coeficiente de multiplicación.

#### Análisis estadísticos

Para analizar los datos se empleó las pruebas de Kruskal Wallis/ Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianzas, mediante el paquete estadístico SPSS versión 18.0 sobre Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Establecimiento *in vitro*

La época del año y la concentración de NaClO influyeron en el establecimiento *in vitro* de los explantes de *A. vera*. El tratamiento, que incluía la época de seca y 2.0% de NaClO fue el que presentó el mayor valor de explantes libres de contaminación microbiana visible (Tabla 1), con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos.

Se obtuvieron porcentajes de contaminación microbiana que oscilaron desde 6.66% hasta 100% dependiendo de la época del año y de la concentración del desinfectante. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los hijuelos fueron seleccionados en la época de seca. En estas condiciones se encontraron porcentajes de contaminación microbiana de 6.66 hasta 33.3%, mientras que en la época de lluvia los valores oscilaron entre 65 y 100%. El menor valor obtenido fue inferior al referido por Albany *et al.* (2006) quienes informaron 14.2% de contaminación microbiana al utilizar 2.0% de NaClO cuando propagaron *in vitro* plantas de *A. vera*. Es notable destacar el uso de bicloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) en los procesos de desinfección (Das *et al.*, 2010; Jayakrishna *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de la baja contaminación referida por los autores, el  $HgCl_2$  es un producto muy tóxico, tanto para el explante como para la salud humana y no se elimina con facilidad, por lo que no se justifica su uso (Marulanda *et al.*, 2005).

Los resultados confirman la importancia de la fase preparativa de la propagación *in vitro*, la cual es descrita como una muy importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de propagación eficiente y repetible (George, 2008). Esta fase tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético.

Tabla 1. Efecto de la época del año y del NaClO en la desinfección de *Aloe vera* L. a las cuatro semanas de cultivo.

Tratamiento (Época del año-% NaClO)	No. explantes libres de contaminación microbiana		No. explantes necrosados	
	Medias	Rango promedio	Medias	Rango promedio
Seca-1.0%	40	291.83 b	0	240.00 a
Seca-2.0%	56	353.17 a	0	240.00 a
Seca-3.0%	48	322.50 b	10	201.67 b
Lluvia-1.0%	0	138.50 e	0	240.00 a
Lluvia-2.0%	21	219.00 c	0	240.00 a
Lluvia-3.0%	19	165.81 d	9	227.06 b

Letras desiguales en las columnas indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/ Mann Whitney para  $p \leq 0.05$ . No. de explantes desinfectados corresponde a la sumatoria de los explantes utilizados en las tres repeticiones realizadas  $n=60$



La contaminación microbiana constituye uno de los problemas principales en esta fase. Incuestionablemente, la mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* provienen de la planta donadora (George, 2008). Según muestra la literatura científica consultada los procedimientos más frecuentes se relacionan con la aplicación de desinfectantes o mezclas de fungicidas y bactericidas en el material de plantación (estacas, secciones nodales) (Albany *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2010; Jayakrishna *et al.*, 2011). Sin embargo, en ninguno de los estudios revisados se hace referencia a la importancia de la selección de la época del año y la influencia de las temperaturas y las precipitaciones en los altos índices de contaminación. Según demuestran los resultados alcanzados este es un factor vital para la disminución de los porcentajes de contaminación en la fase de establecimiento en *A. vera*.

La superficie de los tejidos de las plantas constituye un hábitat para los microorganismos. Estos pueden alojarse en estomas, lenticelas o cualquier otra abertura natural, lo cual dificulta en extremo su eliminación. El número de bacterias y hongos en los tejidos aéreos pueden ser reducidos por el mantenimiento de los mismos en condiciones de baja humedad. En época de seca, donde predominan bajos porcentajes de humedad relativa, temperaturas bajas y escasas precipitaciones, el crecimiento de los microorganismos asociados a los tejidos (fundamentalmente bacterias y hongos) es inferior cuando se compara con el crecimiento en condiciones de altas temperaturas, elevado porcentaje de humedad relativa y abundantes precipitaciones (época de lluvia) (Alvarado-Capó, 1998).

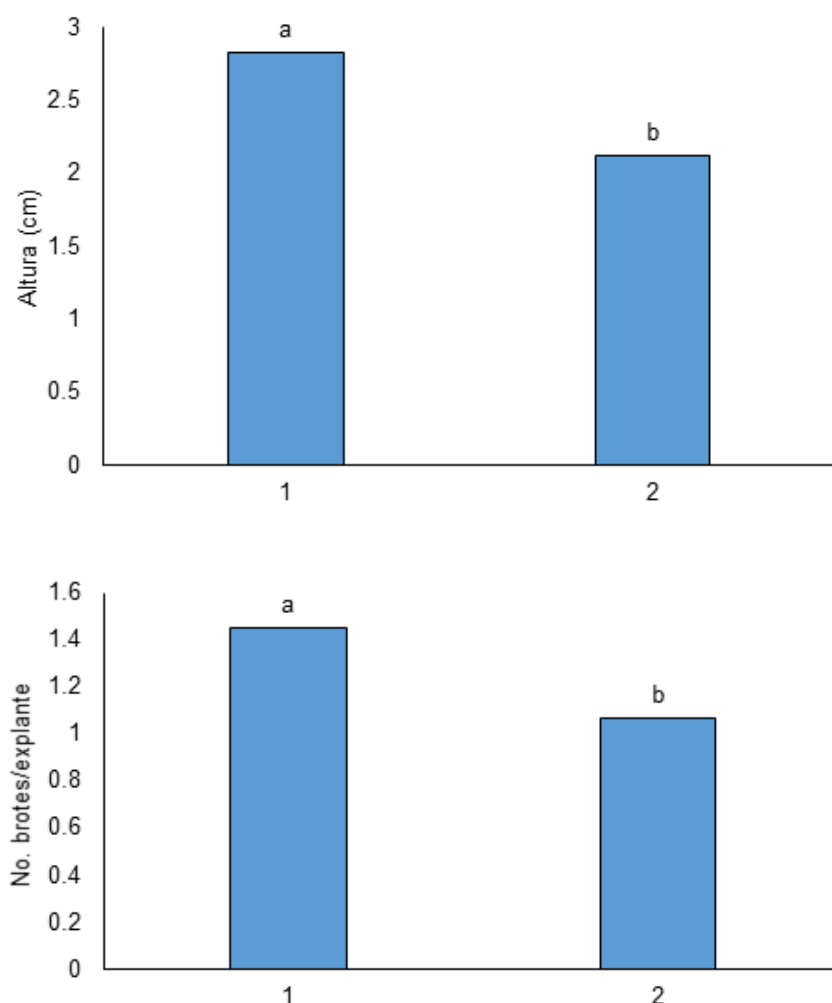
Para la variable número de explantes necrosados se observó que el NaClO a una concentración de 3.0% afectó el material vegetal con los mayores valores de explantes dañados en ambas épocas del año. Estos resultados corroboran los presentados por Albany *et al.* (2006), en *A. vera*, quienes encontraron que a medida que aumentó la concentración de NaClO el ennegrecimiento de los explantes fue mayor. Los autores concluyeron que tiempos prolongados de exposición de los explantes a las sustancias desinfectantes y en concentraciones elevadas, aunque controlaron de forma efectiva la contaminación microbiana, afectaron el porcentaje de brotación de dichos explantes y ocasionaron su muerte debido al efecto fitotóxico de los tratamientos de desinfección.

A las cuatro semanas de cultivo los explantes tenían de una a dos hojas formadas y en algunos se observaron nuevos brotes. Estos presentaron un color verde bosque (#228B22) (según el código hexadecimal de colores (<http://www.cwp.linnet.edu/cwis/cwp.html>)) (Figura 4).

Es evidente que el procedimiento de desinfección propuesto en esta investigación donde se utilizan dos estrategias (época del año para la colecta del material vegetal y el NaClO) contribuye a la disminución de los porcentajes de contaminación microbiana. Además, las medidas relacionadas con la limpieza del material vegetal previo a la desinfección, aspecto que favoreció la reducción de contaminantes microbianos. Esto minimiza el tiempo necesario para el establecimiento *in vitro*, pues no es necesario el cultivo de plantas madre en casas de cultivo lo que incrementa el tiempo en el esquema de propagación.



Figura 4. Aspecto de los brotes de *Aloe vera* L. en el medio de cultivo de establecimiento *in vitro* a las cuatro semanas de cultivo.



Letras desiguales en cada gráfico indican diferencias significativas para cada variable según prueba de Mann Whitney para  $p \leq 0.05$

Figura 5. Influencia del manejo del explante en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera* L. a los 45 días de cultivo. 1- Corte transversal. 2- Corte transversal-longitudinal parcial.

## Multiplicación *in vitro*

### Manejo del explante

El manejo del explante utilizado influyó en el crecimiento y desarrollo de los brotes. Se encontraron diferencias significativas para las variables número y altura de los brotes, cuando se compararon los dos cortes realizados a los explantes durante la fase de multiplicación.

Los mayores valores para la altura de los brotes se encontraron cuando se realizó el corte transversal en los explantes. Asimismo, el número de brotes fue mayor con este tipo de

corte y difirió significativamente con el corte transversal-longitudinal parcial (Figura 5).

En ambos tratamientos los brotes obtenidos presentaron una coloración verde bosque (#228B22) y el tejido era turgente sin síntomas de hiperhidricidad (Figura 6).

Cuando se determinó el coeficiente de multiplicación se encontraron valores promedios de 1.45 en el tratamiento donde se le realizó el corte transversal a los explantes, mientras que con el corte transversal-longitudinal parcial los explantes alcanzaron un coeficiente de 1.1.



Figura 6. Brotes de *Aloe vera* L. obtenidos con diferente manejo de los explantes a los 45 días de cultivo. a-Corte transversal, b-Corte transversal-longitudinal parcial.

Uno de los factores que influyen en la multiplicación *in vitro* de los brotes es el manejo que se realiza al explante en el momento de los subcultivos. En varias especies de plantas se realizan cortes totales o parciales de los explantes, así como se decapitan con la finalidad de inhibir la dominancia de la yema apical y propiciar el desarrollo de las pequeñas yemas axilares (George, 2008).

En el cultivo de *Aloe vera*, Albany *et al.* (2006) evaluaron el efecto del seccionamiento del explante en interacción con el estado físico del medio de cultivo (semi-sólido y líquido en agitación) y determinaron que solo el medio de cultivo líquido favoreció la altura de las plantas obtenidas *in vitro* sin aparente incremento en el número de brotes y que la interacción entre estos dos factores no resultó ser significativa. En contraposición, en el presente trabajo el manejo del explante utilizado influyó en el crecimiento y desarrollo de los brotes. Se encontraron diferencias significativas para las variables número y altura de los brotes y se obtuvo el mejor resultado con el corte transversal. Estos resultados pudieron deberse a que en el corte transversal - longitudinal parcial se indujo un declive en la actividad del tejido meristemático como consecuencia del daño al explante debido a los cortes, que pudo afectar la regeneración celular, el crecimiento y desarrollo de la planta.

Por los resultados obtenidos se seleccionó el corte transversal como el mejor manejo ya que favoreció el incremento del coeficiente de multiplicación.

#### *Efecto de la combinación de auxina-citoquinina en la multiplicación in vitro*

Las diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento estudiados influyeron en el desarrollo de los brotes (Tabla 2).

Con la concentración de 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB la altura de las plantas fue mayor a 5.0 cm como promedio y el número de brotes que se desarrollaron por explante fue superior a cuatro con diferencias significativamente con los demás tratamientos.

Los brotes obtenidos presentaron una coloración verde bosque (#228B22) en sus hojas. Estas eran vigorosas y turgentes, sin síntomas de hiperhidricidad (Figura 7).

Estos resultados fueron similares a los referidos por Jayakrishna *et al.* (2011) en *Aloe barbadensis* Miller, quienes emplearon en los medios de cultivo 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP. Esta es en general la citoquinina más efectiva en la inducción de yemas axilares. Sin embargo, un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es



necesario para la multiplicación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. En este trabajo fue imprescindible la presencia de citoquinina y auxina en los medios de cultivo para producir una mayor proliferación de brotes. Los mejores resultados se obtuvieron cuando fue añadido al medio de cultivo 6-BAP y AIB. Uno de los posibles efectos de las auxinas en esta fase es anular el efecto depresivo de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer su crecimiento normal. Similares resultados fueron obtenidos por Das *et al.* (2010) en *A. vera* en cuanto al empleo de la

combinación de ambos tipos de reguladores del crecimiento.

Por otra parte, la proliferación de brotes disminuyó considerablemente cuando la concentración de 6-BAP se elevó hasta a 8.0 mg l<sup>-1</sup>. Resultados similares fueron descritos en *A. polyphylla* cuando se incrementó la concentración de otra citoquinina, en este caso la Zeatina a 3.29 mg l<sup>-1</sup> (Ivanova y Van Staden, 2011).

Es conocido que la presencia de determinadas concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo pueden inducir hiperhidricidad en las plantas (Quiala *et al.*, 2012). En el presente trabajo con ninguna de las concentraciones de 6-BAP utilizadas se encontraron plantas hiperhídricas.

Tabla 2. Influencia de la combinación de reguladores del crecimiento en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera* L. a los 45 días de cultivo.

Tratamiento 6-BAP-AIB (mg l <sup>-1</sup> )	Altura (cm)		No. de brotes/explante		No. de raíces/explante	
	Media	Rango promedio	Media	Rango promedio	Media	Rango promedio
0-0	2.87	97.39 d	1.30	62.50 c	1.70	79.59 d
2.0-0	2.46	74.63 de	1.90	108.31 b	2.00	93.01 cd
8.0-0	2.35	67.04 e	2.12	121.50 b	1.60	75.60 d
0-0.5	3.19	121.88 c	1.97	104.06 b	3.78	171.79 b
2.0-0.5	5.19	207.48 a	4.80	207.99 a	4.15	190.09 a
8.0-0.5	3.90	157.57 b	2.20	122.06 b	2.53	114.65 c

Medias con letras desiguales en cada columnas indican diferencias significativas según prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para  $p \leq 0.05$



Figura 7. Plantas de *Aloe vera* L. después de 45 días de cultivo en los medios de cultivo de multiplicación. 1- sin reguladores del crecimiento, 2- 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.0 mg l<sup>-1</sup> de AIB, 3- 8.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.0 mg l<sup>-1</sup> de AIB, 4- 0.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB, 5- 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB, 6- 8.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB.

Ivanova y Van Staden (2011) en *A. polyphylla* encontraron diferencias en el porcentaje de plantas con estas características en dependencia del agente gelificante utilizado. Cuando se empleó el agar en el medio de cultivo los porcentajes de plantas hiperhídricas fueron de 17.2%, mientras que cuando utilizaron Gelrite® los porcentajes se incrementaron a 64.7%. En esta investigación se utilizó agar como gelificante en los medios de cultivo lo que pudiera ser el motivo de la no aparición de plantas con hiperhidricidad, fenómeno negativo en los procesos de propagación.

Con todas las concentraciones de reguladores del crecimiento ensayadas las plantas desarrollaron el sistema radical. Es de destacar que las plantas obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación que contenía 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB presentaron el mayor número de raíces cuando se compararon con los demás tratamientos.

Esto pudo deberse a que el medio de cultivo contenía carbón activado y este compuesto tiene como efecto absorber diferentes sustancias excretadas por la planta, las cuales inhiben la formación de raíces según su grado de toxicidad. En esta respuesta también pudo influir la concentración endógena de reguladores del crecimiento, fundamentalmente AIA pues cuando el potencial osmótico del medio de cultivo se hace más negativo, se limita a la absorción de los componentes del medio de cultivo. Esto trae consigo una disminución en la disponibilidad de glucosa en los brotes y la presencia de auxina conjugada con incremento de la auxina activa en

relación favorable con el alargamiento de la raíz (George, 2008).

Por el contrario, en investigaciones realizadas por Albany *et al.* (2006) en *A. vera* se necesitó subcultivar brotes en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento para lograr la inducción de las raíces a los 21 días de cultivo. Por su parte, Das *et al.* (2010) lograron el enraizamiento de plantas de *A. vera* cuando utilizaron en el medio de cultivo de enraizamiento AIB y ANA con solamente 80% y 77% de brotes enraizados respectivamente, valores inferiores a los obtenidos en la presente investigación donde se alcanzó 100%. Además, es importante señalar que no fue necesaria una fase de enraizamiento, lo que trae como ventaja una reducción del ciclo de cultivo al lograr el enraizamiento a la vez que se multiplican los brotes.

Cuando se incrementó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo de 2.0 mg l<sup>-1</sup> a 8.0 mg l<sup>-1</sup> el número de raíces disminuyó, lo cual pudiera estar relacionado con el desbalance entre auxina/citoquinina que se produjo. Las raíces formadas *in vitro* pueden favorecer el crecimiento inicial *ex vitro*, aunque la tasa de crecimiento óptima no ocurrirá hasta que las nuevas hojas y raíces se desarrollen en el ambiente *ex vitro*. La funcionalidad de las raíces quedó demostrada en este trabajo con la supervivencia de las plantas durante la aclimatización.

Cuando se calculó el coeficiente de multiplicación de los explantes en los nueve subcultivos estudiados se observó que este se mantuvo estable, como valor máximo 5.1 (Figura 8).

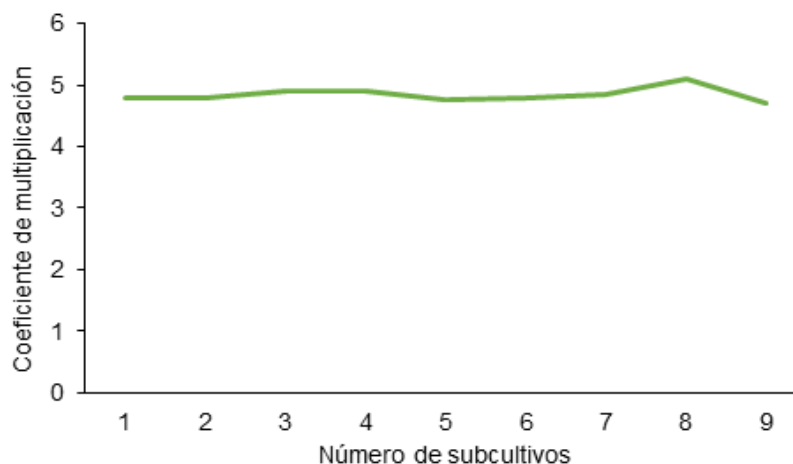


Figura 8. Coeficiente de multiplicación de *Aloe vera* L. obtenido en el medio de cultivo de multiplicación que contenía 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB en diferentes subcultivos.

En la literatura científica se refiere que la tasa de multiplicación de *Aloe vera* superior a dos yemas nuevas comienza a observarse a partir del cuarto subcultivo y solo desciende a partir del séptimo cuando el potencial genético disminuye por envejecimiento del tejido (Matos, 2007). No fue así en el presente trabajo, donde la evaluación del coeficiente de multiplicación realizada a los brotes durante nueve subcultivos se mantuvo estable. Esta variable es una de las más importantes en los procesos de propagación.

Los resultados obtenidos permiten disponer de una metodología *in vitro* para la obtención de plantas de *Aloe vera* L.

## REFERENCIAS

- Aggarwal D, Barna K (2004) Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* L. Plant Biochemistry and Biotechnology (13): 19-23
- Albany N, Vilchez J, León de Sierralta S, Molina M, Chacín P (2006) Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. Rev. Fac. Agron. 23: 213-222
- Alvarado-Capó Y (1998) Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez Ponce J (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 81-104. IBP. Santa Clara
- Amoo S, Aremu A, Van Staden J (2012) *In vitro* regeneration, secondary metabolite production and antioxidante activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. Plant Cell Tiss Organ Cult 111: 345-358
- Arvind KB, Negi J, Bisht V, Bharti M (2010) *In vitro* propagation of *Aloe vera* - A plant with medicinal properties. Nature and Science 8(8): 174-176
- Das A, Mukherjee P, Jha TB (2010) High frequency micropropagation of *Aloe vera* L. Burm. F. as a low cost option towards commercialization. Plant Cell Tiss Organ Cult 20 (1): 29-35
- George EF (2008) Plant Tissue Culture Procedure-Background. En: George EF, Hall MA, de Klerk GJ (Eds) Plant Propagation by Tissue Culture -3<sup>rd</sup>. Edition. Vol 1. The Background, pp. 1-28. Springer. Dordrecht
- Grace OM (2011) Current perspectives on the economic botany of the genus *Aloe* L. (*Xanthorrhoeaceae*). S Afr J Bot 77:980-987
- Imery-Buiza, J, Cequea-Ruiz H (2008) Autoincompatibilidad y Protandria en poblaciones naturalizadas de *Aloe vera* de la península de Araya. Polibotánica 26: 113-125
- Ivanova M, Van Staden J (2011) Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. Plant Cell Tiss Organ Cult 104: 13-21
- Jayakrishna C, Karthik C, Barathi S, Kamalanathan D, ArulSelvi P (2011) *In vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Miller, a miracle herb. Research in Plant Biology 1(5): 22-26
- Lubbe A, Verpoorte R (2011) Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. Industrial Crops and Products 34: 785-801
- Marulanda M, Gutiérrez L, Márquez M (2005) Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal 27(82): 5-15
- Matos A (2007) Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. (zábila). Ciencia 15(3): 319-330
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Quiala E, Cañal MJ, Meijón M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L, de Fera M, Barbón R (2012) Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. Plant Cell Tiss Organ Cult 109: 223-234
- Yesil-Celiktas O, Vardar-Sukan F (2013) Downstream Processes for plant cell and tissue culture. En: Chandra S, Lata H, Varma A (Eds) Biotechnology for Medicinal Plants, pp. 1-27. Springer-Verlag. Berlin
- Zárate R, el Jaber-Vazdekis N, Verpoorte R (2013) Metabolic Engineering of Plant Cellular Metabolism: Methodologies, Advances, and Future Directions. En: Chandra S, Lata H, Varma A (Eds) Biotechnology for Medicinal Plants, pp. 359-393. Springer-Verlag. Berlin

Recibido: 15-01-2014

Aceptado: 08-05-2014